AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 67, №2, səh. 96-101 (2012)

Влияние Экстракта Шафрана на Антиоксидантную Систему Организма При Облучении в Дозе 2 Гр

Х.Ф. Бабаев[1], **И.А. Рзаева**[2]
[1]*Институт Физиологии им. А.И.Караева НАНА, ул. Шариф-заде 2, Баку AZ1100, Азербайджан*
[2]*Институт Радиационных Проблем НАНА, ул. Б.Вагабзаде 9, Баку AZ1143, Азербайджан,*
E-mail: rzayja@yahoo.com

Показано, что действие рентгеновского облучения в дозе 2 Гр приводит к подавлению активности исследуемых ферментов в различных структурах мозга. Также было установлено, что рентгеновское облучение на фоне предварительного введения экстракта шафрана в большинстве случаев не приводит к подавлению активности исследуемых ферментов, а наоборот, этот антиоксидант способствует повышению их активности в исследованных нами структурах мозга.
Ключевые слова: рентгеновское облучение, антиоксидантная система, шафран.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования биологического действия излучения малых величин и мощностей доз ионизирующих излучений является часто обсуждаемым вопросом среди радиобиологов в последние годы (Ткаченко и др., 2009; Котеров и др., 2009; Ермаков и др., 2009). Ряд эффектов, которые характерны для воздействия радиации в малых дозах, названы «немишенными», т.е. косвенными эффектами облучения (Prise et al., 2002; Upton, 2001), так как они (70-90% повреждений ДНК) могут не являться прямым эффектом квантов на эту макромолекулу. В большинстве случаев повреждение не является непосредственно результатом начальных повреждений ДНК, вызванных облучением и объясняется нарушением ее структуры свободными радикалами кислорода и продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Ярмоненко и др., 2004; Бурлакова, 2007; Feinendegen, 2002; Pollycove et al., 2003; Владимиров, 2000). К этим эффектам можно отнести, например, адаптивный ответ, гормезис, эффект свидетеля (bystander effect) и др. Показано, что при воздействии малых доз ионизирующей радиации наблюдается улучшение иммунных функций, увеличение продолжительности жизни, а также предотвращение развития некоторых болезней (Takahashi et al., 2000). К примеру, в работе (Ермаков и др. 2009) продемонстрирована отчетливая тенденция к увеличению АО активности плазмы крови мышей после облучения в малой дозе 0,2 Гр (согласно NCRP США, НКДАР и др. (Report to the General Assembly, 1999; Котеров, 2004). Основываясь на данные Генеральной Ассамблеи, малыми дозами также принято считать дозы до 20 сГр (200 мЗв) (Hayes, 2008).

Известно, что малые дозы радиации вызывают ряд реакций, которые могут не фиксироваться при облучении в высоких дозах. Помимо этого, при совместном действии с другими агентами, эффекты действия радиации в низких дозах могут быть более опасными (Пелевина и др., 2003). Следует, отметить, что исследования, посвященные последствиям чернобыльской катастрофы, дали огромное количество новых фактов, касающихся влияния низкоинтенсивного облучения на живые объекты. Получены данные по повышенном повреждающем действии низкоинтенсивного облучения (Бурлакова, 1996; Crompton1998). Через 4 года после аварии на ЧАЭС авторами работы (Иваненко и др., 2003) были обследованы ликвидаторы, работавшие в первые дни аварии. Зафиксировано достоверное понижение содержания восстановленного и повышение окисленного глутатиона (Иваненко и др.,2003).

Защита организма от действия свободных радикалов и перекисных соединений, возникающих, в частности, при облучении, обеспечивается разными системами АО защиты: природными антиоксидантами (глутатион, токоферол, флавоноиды и др.) и ферментами АО защиты (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидазы, в частности, глутатион-зависимые пероксидазы). Помимо этого существует ряд эндогенных соединений (мочевина, аскорбиновая кислота, низкомолекулярные аминокислоты и др.), которые проявляют АО активность в многокомпонентных биологических системах (Зенков и др., 2001; Кения и др.,1993)

До сегодняшнего дня показана роль АО статуса в формировании последствий биологического действия низкоинтенсивного излучения в малой дозе. Стало известно, что низкоинтенсивное излучение в малой дозе приводит к нарушению взаимосвязей между органами и дисбалансу биохимических функций в организме (Шишкина и др., 2000).

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в условиях ингибирования одного из основных ферментов системы АО защиты – СОД, наблюдается возрастание повреждающего действия γ-излучений в клетках человека. Соответственно это доказывает незаменимую роль этого фермента в защите от повреждающего действия свободных радикалов, образующихся при воздействии γ-излучения (Яковлева и др., 2002).

В результате нарастания содержания АФК в тканях на фоне истощения резервов АО защиты, биомолекулы подвергаются окислительной модификации, наблюдается изменение активности ферментных систем и нарушение структуры мембран (Дубинина, 2001; Меньшикова и др., 2006). Так как в большинстве случаев эндогенная АО система не справляется с патологическим повреждением, требуется поступление дополнительных антиоксидантов в организм (Меньшикова и др., 2006; Петров и др., 2004). Антиоксидантные действия шафрана на структурные, метаболические и регуляторные системы организма, обеспечивается разнообразием его химического состава (Касумов и др., 2002; Abdullaev и др., 1993).

Учитывая выше сказанное, целью данной работы является выявление антиоксидантных и радиопротекторных свойств экстракта шафрана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на белых крысах массой 180±20 г. Различные структуры головного мозга (продолговатый мозг, мозжечок, зрительная и сенсомоторная кора) исследовались по следующей схеме: I группа - контроль, II группа – рентгеновское облучение, III группа - рентгеновское облучение + экстракт шафрана. В течение 21 дня до облучения в организм животных предварительно был введен экстракт шафрана per os в дозе 120 мг/кг. При облучении показатели были зафиксированы после 1 часа, 3 и 6 суток.

Рентгеновское облучение проводили на аппарате «РУМ-17» при следующих условиях: напряжение 180 кВ, сила тока 15 мА, фильтры 0,5 мм Cu и 1,0 мм Al, КФР 30 см без тубуса, мощность дозы 0,86 Гр/мин, доза облучения 2 Гр.

После облучения животных рентгеновским лучами в летальной дозе в их состоянии наблюдаются следующие изменения: шерсть стоит торчком, выпадает, наблюдается понос, кровотечение из носа, из ротовой полости, через 3-5 дней наблюдается гибель животных. При введении экстракта шафрана до воздействия рентгеновского облучение изменения в состоянии животных и их гибель прослеживаются в более поздние сроки.

Активность антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы (ГПО), каталазы и СОД измеряли по ниже перечисленным методам соответственно: (Paglia et al., 1967; Bergmeyer, 1971; Beauchamp et al., 1971). Определение белков проводилась по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пероксидазы в самых различных реакциях активируют H_2O_2 и гидропероксиды ROOH, но не пероксиды ROOR. В свойствах и действии различных пероксидаз много общего, хотя имеются также некоторые специфические особенности в отдельных стадиях, катализируемых ими процессов.

В прошлом веке получен огромный экспериментальный материал по составу, строению, свойствам и механизму действия пероксидаз различного происхождения, обобщенный во многих монографиях и обзорах (Метелица, 1984). Детально исследованы свойства различных состояний пероксидазы хрена и их роль в пероксидазном катализе (Dunford et al., 2007). В данной работе объектом исследований были ткани продолговатого мозга, мозжечка, сенсомоторной и зрительной коры. О состоянии антиоксиданта в данных структурах судили по активности каталазы, ГПО и СОД. Анализы проводились через час, 3-й и 6-й суток после рентгеновского излучения в дозе 2 Гр и при совместном воздействии рентгеновского излучения и экстракта шафрана.

Поскольку известно, что антиоксиданты обладают свойствами «ловушек» супероксидных радикалов, можно предположить, что эти активные вещества участвуют в ингибировании ПОЛ. На основании экспериментальных данных можно заключить, что предварительное введение экстракта шафрана облученным крысам способствует снижению уровня радикалообразования и тем самым приводит к снижению продуктов ПОЛ.

Таким образом, экстракт шафрана, введенный до облучения, проявляет антиоксидантное свойство и увеличивает устойчивость крыс к воздействию радиации.

Нашими предыдущими исследованиями было показано, что облучение приводит к подавлению активности каталазы во всех изучаемых структурах головного мозга. Однако степень подавления активности каталазы в различных структурах мозга проявлялось по-разному (табл. 1).

Таблица 1. Влияние рентгеновского облучения в дозе 2 Гр и экстракта шафрана на динамику изменения активности каталазы (усл. ед. $мг_{белка}$), M±m, n=30.

		Продолговатый мозг	Мозжечок	Зрительная кора	Сенсомоторная кора
1. Контроль		254,34±2,31	241,82±2,41	224,34±2,12	234,64±2,01
2. Рент. облуч.	1 час	241,88±2,18	235,64±2,13	214,64±2,11	221,13±2,18
	P_{2-1}	<0,001	<0,05	<0,01	<0,05
3.	3-й день	240,12±2,24	230,13±2,11	210,11±2,04	218,14±2,26
	P_{3-1}	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001
4.	6-й день	247,26±2,12	238,64±2,09	217,18±2,08	226,84±2,43
	P_{4-1}	<0,01	<0,001	<0,05	<0,01
5. Рент. облуч.+	1 час	248,12±2,13	238,21±2,03	218,46±2,12	228,64±2,04
Шафран	P_{5-1}	<0,01	<0,05	<0,01	<0,01
6.	3-й день	250,13±2,19	240,14±2,13	216,41±2,21	226,44±2,03
	P_{6-1}	<0,05	<0,01	<0,05	<0,001
7.	6-й день	253,24±2,21	241,34±2,01	221,14±2,03	231,64±2,17
	P_{7-1}	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001

Примечание: Р - статистически достоверно по отношению к контролю.

Таблица 2. Влияние рентгеновского облучения в дозе 2 Гр и экстракта шафрана на динамику изменения активности ГПО (нмоль $NADP^+$/мин./мг белок), M±m, n=30.

		Продолговатый мозг	Мозжечок	Зрительная кора	Сенсомоторная кора
1. Контроль		14,8±0,82	11,6±0,74	23,4±0,84	27,4±1,18
2. Рент. облуч.	1 час	12,4±0,52	10,3±0,61	20,2±0,71	25,6±1,12
	P_{2-1}	<0,01	<0,001	<0,01	<0,05
3.	3-й день	11,2±0,43	9,8±0,91	18,6±0,44	23,4±1,18
	P_{3-1}	<0,01	<0,001	<0,01	<0,01
4.	6-й день	13,6±0,91	10,7±0,78	19,3±0,21	24,6±1,14
	P_{4-1}	<0,05	<0,05	<0,01	<0,001
5. Рент. облуч.+	1 час	14,6±0,48	11,2±0,44	22,8±0,91	26,8±1,18
Шафран	P_{5-1}	<0,001	<0,05	<0,01	<0,01
6.	3-й день	13,4±0,53	10,9±0,43	21,7±0,88	25,6±1,13
	P_{6-1}	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05
7.	6-й день	14,7±0,42	11,2±0,52	23,2±0,78	26,7±1,12
	P_{7-1}	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001

Примечание: Р - статистически достоверно по отношению к контролю.

Наибольшее ингибирование каталазы было обнаружено в сенсомоторной (-7%) и зрительной (-6%) областях коры, значительно меньше (через 3 сут) в продолговатом мозге (-5,6%) и в мозжечке (-4,8%). Предварительное введение животным экстракта шафрана в определенной степени предотвращало такое повышение скорости процессов ПОЛ в тканях мозга. Следовательно, снижение продуктов ПОЛ в тканях мозга под воздействием экстракта шафрана могло бы отражаться и на степени активности каталазы.

Результаты, полученные при исследовании фермента ГПО, продемонстрированы на табл. 2.В таблице активность ГПО через час после рентгеновского облучения в дозе 2 Гр во всех исследуемых структурах головного мозга. Наибольшее ингибирование активности фермента ГПО наблюдалось на 3-е сутки опыта. Так, через три дня после облучения рентгеновскими лучами в дозе 2 Гр активность фермента в продолговатом мозге была ниже на 24% (при сравнении с интактным показателем), в мозжечке – на 15,5%, в зрительной коре – на 20,5%, в сенсомоторной коре – на 14,5%. Через 6 дней после облучения снижение активности фермента во всех исследуемых структурах мозга приостанавливается, но остается ниже при сравнении с таковым показателем в интактной группе.

На табл. 2 показана динамика изменения активности фермента ГПО в различных структурах мозга под влиянием экстракта шафрана на фоне рентгеновского облучения в дозе 2 Гр. Анализ данных показал, что предварительное введение экстракта шафрана приводит к небольшому снижению активности фермента во всех исследуемых структурах мозга. Как видно из таблицы ,активность ГПО в продолговатом мозге через час после облучения животных была снижена на 1%, в мозжечке на 3%, в зрительной коре – на 2,5%, в сенсомоторной коре – на 2% (при сравнении с интактными показателями). Через 3 дня эти показатели были выше в продолговатом мозге на 19,6%, в мозжечке на 11%, в зрительной коре на 16,6%, в сенсомоторной коре на 1% (при сравнении с таковыми показателями в группе, где животные подвергались лишь рентгеновскому облучению в дозе 2 Гр).

Таблица 3. Влияние рентгеновского облучения в дозе 2 Гр и экстракта шафрана на динамику изменения активности СОД (в усл. ед./мг $_{белка}$), M±m, n=30.

		Продолговатый мозг	Мозжечок	Зрительная кора	Сенсомоторная кора
1. Контроль		227,0±20,9	211,8±21,6	248,6±21,8	261,3±24,6
2. Рент. облуч.	1 час	210,6±18,4	205,6±24,3	221,8±22,4	240,4±21,3
	P_{2-1}	<0,01	<0,001	<0,01	<0,01
3.	3-й день	210,5±21,4	203,8±21,4	214,6±18,8	230,6±20,4
	P_{3-1}	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05
4.	6-й день	220,6±18,3	207,9±26,4	224,6±17,3	248,3±23,1
	P_{4-1}	<0,01	<0,001	<0,01	<0,01
5. Рент. облуч.+	1 час	215,3±21,6	210,1±21,8	230,3±24,6	250,3±22,2
Шафран	P_{5-1}	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01
6.	3-й день	216,4±20,6	210,8±20,3	228,4±20,8	245,8±21,4
	P_{6-1}	<0,001	<0,01	<0,05	<0,01
7.	6-й день	223,6±21,3	210,9±21,4	235,6±20,3	254,4±24,6
	P_{7-1}	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05

Примечание: P - статистически достоверно по отношению к контролю.

На 6-е сутки опыта активность фермента во всех исследуемых структурах мозга восстанавливались и приближались к показателям в интактной группе.

На табл. 3 показано изменение активности фермента СОД в различных структурах мозга под влиянием экстракта шафрана на фоне рентгеновского облучения в дозе 2 Гр. Как показано на табл. 3 через час после облучения активность фермента СОД во всех исследуемых структурах понижается, при сравнении с показателями в интактной группе. В последующие сроки после облучения наблюдалась аналогичная тенденция. А именно активность фермента на 6-е сутки в продолговатом мозге была ниже на 2,8%, в мозжечке – на 1,8%, в зрительной коре – на 9,6%, в сенсомоторной коре – на 5% при сравнении с показателями в интактной группе.

Дальнейший анализ данных показал, что предварительное введение экстракта шафрана достоверно предотвращает ингибирование активности фермента СОД в тканях мозга, вызванного дозой облучения 2 Гр. Для сравнения отметим, что активность фермента СОД в продолговатом мозге после 1 часа введения экстракта шафрана составило 215,3±21,6 усл. ед./мг белка, на 3-й день – 216,4±20,6 усл. ед./мг белка, на 6-й день – 223,6±21,6 усл. ед./мг белка (что на 1% выше активности фермента при сравнении с таковым показателем в группе, где животные подвергались лишь рентгеновскому облучению в дозе 2 Гр). При последовательном воздействии экстракта шафрана и рентгеновского облучения активность СОД в мозжечке, зрительной коре и сенсомоторной коре через час после облучения была выше на 2%, 3,8% и 4% соответственно показателя в группе, где животные подвергались лишь рентгеновскому облучению. В последующие сроки эксперимента (а именно на 3-й и 6-й день) активность фермента в указанных отделах мозга оставалась выше такого показателя в группе, где животные подвергались рентгеновскому облучению.

Таким образом, влияние экстракта шафрана на активность исследованных ферментов, подвергшихся изменению под влиянием рентгеновского облучения, неоднозначно, и это различие проявляется как на макро-, так и на микроуровнях организации мозга.

ЛИТЕРАТУРА

Бурлакова Е.Б. (2007) Роль мембран в повреждении структурных и функциональных характеристик клеток при облучении животных в низких дозах. Матер. междунар. конф. «Новые направления в радиобиологии». М.: РУДН, 3-9.

Владимиров Ю.А. (2000) Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский образовательный журн. ISSEP. **6 (12):** 13-19.

Дубинина Е.Е. (2001) Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса. Вопросы медицинской химии, **47 (6):** 561-581.

Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В. и др. (2009) Реакция раковых стволовых клеток человека на воздействие ионизирующего излучения в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология, **49 (5):** 528-537.

Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. (2001) Окислительный стресс: биохимические и патофизиологические аспекты. М.: МАИК Наука/Интерпериодика. 343 с.

Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б. (2003) Действие малых доз радиации на статус глутатиона детского и взрослого населения после аварии на ЧАЭС. Радиационная биология. Радиоэкология, **43 (2):** 189-192.

Касумов Ф.Ю., Несруллаева Г.М., Абдуллаева И.М. (1993) Биологическая характеристика

и химический состав шафрана посевного. Современные проблемы офтальмологии. Баку: 95-98.

Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. (1993) Роль низкомолекульярных антиоксидантов при окислительном стрессе. Успехи соврем. биол., **113 (4):** 456-470.

Котеров А.Н. (2004) Малые дозы ионизирующей радиации: подходы к определению диапазона и основные радиобиологические эффекты. Радиационная медицина. Под общ. ред. акад. РАМН Л.А. Ильина. Т. 1: Теоретические основы радиационной медицины. М., ИздАТ: 871-925.

Котеров А.Н., Сидорович Г.И. (2009) Разнонаправленное изменение антиоксидантной активности в плазме (сыворотке) крови млекопитающих после воздействия радиации в большой и малой дозе. Радиац. биол. Радиоэкол., **49 (6):** 671-680.

Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М., Слово: 556 с.

Метелица Д.И. (1984) Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 293 с.

Пелевина И.И., Алещенко А.В., Антошина М.М. и др. (2003) Реакция популяции клеток на облучение в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология, **43 (2):** 161-166.

Петров А.Ю., Коваленко А.Л., Романцов М.Г. (2004) Антиоксидантная терапия как компонент лечения воспалительных процессов в печени. Вестник СПбГМА им. И.И.Мечникова. **№4:** 152-153.

Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье человека (1996) Под ред. Е.Б. Бурлаковой. М.: Центр экол. полотики России, 289 с.

Ткаченко Н.М., Коцюруба А.В., Базилюк О.В. и др. (2009) Сосудистая реактивность и метаболизм реактивных форм кислорода и азота при действии низких доз радиации. Радиационная биология. Радиоэкология., **49(4):** 462-472.

Шишкина Л.Н., Кушниревa Е.В., Беспалько О.Ф., Польякова Н.В. (2000) Роль антиоксидантного статуса в формировании последствий биологического действия низкоинтенсивного излучения в малой дозе. Радиац. биол. Радиоэкол., **40 (2):** 162-167.

Яковлева М.Н., Синельщикова Т.А., Перминова И.Н., Засухина Г.Д. (2002) Роль супероксиддисмутазы в поддержании клеточного гомеостаза при воздействии γ-излучения и сульфата никеля. Радиационная биология. Радиоэкология, **42 (5):** 299-301.

Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. (2004) Радиобиология человека и животных. М.: Высш. шк., 549 с.

Abdullaev F.I. (1967) Biological effects of saffron. J. BioFactors, **4:** 83-86.

Beauchamp C., Fridovich J. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem., **44 (1):** 276-287.

Bergmeyer H.U. (1956) Test for detecting of catalase. Biochem. J., **237:** 255-262.

Biological Effects at Low radiation Doses- Models, Mechanisms and Uncertainties. Report to the General Assembly. 48-session of UNSCEAR. Vienna, 12-16 April, 1999.

Crompton N.E. (1998) Programmed cellular response to ionizing radiation damage. Acta Oncol., **37 (2):** 129-142.

Dunford H.B. (1999) Heme Peroxidases. New York: Wiley-VCH, 230 p.

Feinendegen L.E. (2002) Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. Hum. Exp. Toxicol., **21 (2):** 85-90.

Hayes D.P. (2008) Non-problematic risks from low-dose radiation-induced DNA damage clusters. Dose Response, **6 (1):** 30-52.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol.Chem., **193 (1):** 265-275.

Paglia D., Valentine W. Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab.Clin. Med., **70 (1):** 158.

Pollycove M., Feinendegen L.E. (2003) Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage. Hum. Exp. Toxicol., **22 (6):** 290-306.

Prise K.M., Belyakov O.V., Newman H.C. et al. (2002) Non-targeted Effects of Radiation: Bystander Responses in Cell and Tissue Models. Radiat Prot. Dosimetry, **99 (1-4):** 223-226.

Takahashi M., Kojima S., Yamaoka K. et al. (2000) Prevention of type I diabetes by low-dose gamma irradiation in NOD mice. Radiat. Res., **154 (6):** 680-685.

Upton A.C. (2001) Radiation hormesis: data and interpretations. Crit. Rev. Toxicol., **31 (4-5):** 681-695.

X.F.Babayev, İ.A. Rzayeva

Rentgen Şüalanmasinin 2 Gy Dozasinda Zəfəran Ekstraktinin Orqanizmin Antioksidant Sisteminə Təsiri

Göstərilmişdir ki, 2 Gy dozasinda rentgen şüalanması beynin müxtəlif strukturlarında tədqiq edilən fermentlərin aktivliyinin azalmasına gətirib çıxarır. Həmçinin müəyyən edilmişdir ki, şüalanmadan əvvəl heyvanlara zəfəran ekstraktının verilməsi çox hallarda tədqiq edilən fermentlərin aktivliyinin azalmasına deyl, əksinə artmasına səbəb olur.

Kh.F. Babaev, I.A. Rzaeva

The Effect of Saffron Extract on Antioxydant System of Organism Under X-Ray Irradiation of Dose 2Gy

It was shown that effect of X-ray irradiation at 2 Gy leads to activity suppression of the studied enzymes in various structures of brain. As well as it has been established that on the background of preset of saffron extract, X-ray irradiation in many cases do not lead to activity suppression of the studied enzymes but on the contrary this antioxidant promotes to increase their activity in the brain structures studied by us.